

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2001-204462

(43)Date of publication of application : 31.07.2001

(51)Int.Cl. C12N 15/00
C12N 11/08

(21)Application number : 2000-014391 (71)Applicant : KURABO IND LTD

(22)Date of filing : 24.01.2000 (72)Inventor : KAWAMURA KIYOKO
KITAIRO TSUNEJI
OSHIMA KUNIHIRO
YAMAMOTO RYOHEI

(54) METHOD FOR EXTRACTION OF NUCLEIC ACID

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method for extraction of a nucleic acid using no material harmful to the environment or a human body, and capable of easily treating even a material containing impurities.

SOLUTION: This method for extraction of a nucleic acid comprises a process in which a nucleic acid-containing material is mixed with a solution containing a surfactant, a salt, a buffering agent and a chelating agent, a process in which the obtained mixed solution is brought into contact with a solid support consisting of a polymer having a phosphate ester moiety in at least a part of the structural units and having a hydrophilic surface, and a process in which the solid support is separated from the solution.

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2001-204462

(P2001-204462A)

(43)公開日 平成13年7月31日 (2001.7.31)

(51)Int.Cl.⁷
C 12 N 15/00
11/08

識別記号

F I
C 12 N 11/08
15/00

データコード*(参考)
A 4 B 0 3 3
Z

審査請求 有 請求項の数6 O.L (全13頁)

(21)出願番号 特願2000-14391(P2000-14391)

(22)出願日 平成12年1月24日 (2000.1.24)

(71)出願人 000001096

倉敷紡績株式会社

岡山県倉敷市本町7番1号

(72)発明者 河村 聖子

大阪府寝屋川市下木田町14番5号 倉敷紡
績株式会社技術研究所内

(72)発明者 北廣 恒司

大阪府寝屋川市下木田町14番5号 倉敷紡
績株式会社技術研究所内

(74)代理人 100062144

弁理士 青山 葵 (外2名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 核酸の抽出方法

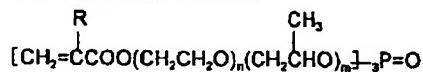
(57)【要約】

【課題】 環境あるいは人体に有害な物質を用いず、不純物を含有する試料でも容易に取り扱える核酸抽出方法を提供する。

【解決手段】 核酸を含む試料を、界面活性剤、塩、緩衝剤およびキレート剤を含む溶解液と混合する工程、得られる混合液を、構造単位の少なくとも一部にリン酸エヌテル部分を有する重合体であって、親水性の表面を有する固相支持体に接触させる工程、および固相支持体を溶解液から分離する工程を含む核酸の抽出方法を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 核酸を含む試料を界面活性剤、塩、緩衝剤およびキレート剤を含む溶解液と混合する工程、得られる混合液を、構造単位の少なくとも一部にリン酸エステル部分を有する重合体であって、親水性の表面を有する固相支持体に接触させる工程、固相支持体を溶解液か



[T]

[式中、Rは水素原子またはメチル基、nは0~30の数を示し、mは0~30の数を示す。但し、m+n ≥ 1である。]を重合成分の少なくとも一部として含むモノマー成分を、該モノマーと重合可能な親水性モノマーと共に重合して得られる重合体である、請求項1記載の方法。

【請求項4】 核酸がDNAである、請求項1記載の方法。

【請求項5】 核酸を含む試料が、血液である請求項1記載の方法。

【請求項6】 界面活性剤、塩、緩衝剤およびキレート剤を含む溶解液、および構造単位の少なくとも一部にリン酸エステル部分を有する重合体であって、親水性の表面を有する固相支持体を含む、核酸抽出用キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は核酸分析のため、出発物質から核酸を抽出する方法を提供する。

【0002】

【従来の技術】近年、核酸分析は医学分野において遺伝疾患の検出や診断、病原因子の解析等に、また食品汚染の検査産業における不純物や遺伝子操作産物の判別などに、さらには遺伝子工学において、操作すべき遺伝子の単離等、様々な場面で用いられる。核酸を分析するにあたり、まず血液、血清、糞便、尿、培養細胞、細菌等さまざまな試料より核酸の抽出、精製を行う必要がある。

【0003】生物由来の試料から核酸精製のための一般的な方法としては例えば特公平7-143879号に記載のごとき方法がある。この方法では、例えば培養細胞からのDNAを抽出するにあたって、界面活性剤や酵素などにより細胞膜、核膜、タンパク質を分解し、次いで多糖類を除去する。その後、フェノールクロロホルム処理を行ってタンパク質分を沈殿させて除去し、水溶液相の核酸をアルコールで沈殿させ、最後に得られた核酸を洗浄する方法である。かかる方法は、少量の試料から比較的多量のものまで試料の量に左右されずに行えるという利点がある。しかしながら、非常に工程数が多く手間が煩雑である点、タンパク質分解酵素反応を利用するため、反応時間がかかり、また酵素が高価な点、およびフェノールークロロホルム抽出工程から出るフェノールとクロロホルムの廃液処理が必要となる点等の問題があ

ら分離する工程、を含む核酸の抽出方法。

【請求項2】 さらに固相支持体から核酸を分離する工程を含む、請求項1記載の方法。

【請求項3】 固相支持体が以下のモノマー(I)：

【化1】

る。

【0004】フェノールクロロホルムを使用しない方法として、核酸のリン酸部分のマイナスイオンを利用して、低イオン濃度下で核酸をクロマト担体に吸着させ、これを洗浄し、次いで高イオン濃度にて核酸を溶出させる方法が知られている。この方法においては、フェノールクロロホルムを基本的には使用しないため、環境には優しい方法であるといえる。しかしながら、高濃度の塩と共に核酸を溶出させた後、脱塩処理が必要となり、またタンパク質が核酸と共に吸着してしまうため、予め何らかの方法によりタンパク質を除いておくか、あるいは厳密に塩濃度を調節することが必要であり、あまり実用的ではない。

【0005】別の方法では、カオトロピックイオンの存在下でガラスやシリカゲルの固体に核酸が吸着するという原理を利用した方法が知られている。この方法は、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. vol. 76 (1979) p615-619および特許第2,680462号に記載されている。ここでカオトロピックイオンとは、大きな半径を有する一価の陰イオンの総称であり、疎水性物質と水が接触する際に生じる水分子のエントロピーの減少を抑制する作用を有するため、疎水性物質を溶解してしまう物質である。かかる方法では、カオトロピックイオンが系へ残存し、後の実験を阻害してしまう可能性が高いこと、およびカオトロピックイオン自身に腐食性及び毒性があるため、取り扱いに多大な注意が必要である。

【0006】さらに、カオトロピックイオンもフェノールクロロホルムも使用しない方法として、特公平7-51065号に開示される、高濃度のエタノール、プロパンノール及びアセトニトリルと、核酸含有物質および固相支持体とを用いて核酸を精製する方法である。この方法は、有機溶媒を高濃度で用いるため、多量のタンパク質を含む試料を処理する場合には、タンパク質が析出し、操作性が悪くなるという問題点がある。

【0007】さらに、特表平11-501504ではかかる毒性があつたり処理が煩雑である溶媒を用いず、界面活性剤で処理した試料を固相に接触させて核酸を抽出する方法を提供する。ここで開示されている方法は、手順が単純で、カオトロピック物質や有機溶媒等を用いる必要がなく、非常に使いやすいものである。

【0008】しかしながら、かかる方法では生体試料、

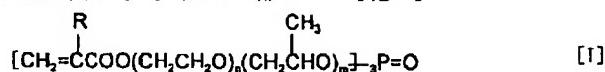
例えば血液や骨髓液等、大量の不純物が混入する試料を大量に取り扱うことができないという弱点がある。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、有機溶媒やカオトロピック物質などの環境あるいは人体に有害な物質を用いず、またタンパク質分解酵素を用いず、生体試料等の不純物が多量に含有された試料でも容易に取り扱える核酸抽出方法を提供することを目的とする。

【0010】

【課題を解決する手段】核酸を含む試料を、界面活性剤、塩、緩衝剤およびキレート剤を含む溶解液と混合する工程、得られる混合液を、構造単位の少なくとも一部



[式中、Rは水素原子またはメチル基、nは0～30の数を示し、mは0～30の数を示す。但し、 $m+n \geq 1$ である。]を重合成分の少なくとも一部として含むモノマー成分を、該モノマーと重合可能な親水性モノマーと共に重合して得られる重合体である。

【0012】固相支持体としては、板、シート、棒、球、粒子等、どのような形状でもよいが、処理液と接触する表面が最大となる、多孔質微粒子とすることが特に好ましく、最も好ましくは平均孔径30～5000Åの多孔質重合体微粒子である。

【0013】かかる重合体については、本出願人による特公平7-62034号(特許第2032772号)公報に開示されている。なお、該特許では、多孔質重合体粒子をタンパク質のクロマトグラフィ用に使用することが開示されているが、上記微粒子が核酸を好適に吸着させることを示唆する記載は無い。

【0014】本発明によって処理し得る試料は、哺乳類由来の血液、骨髓液、糞便、尿、その他の体液、生体組織などの生体試料、培養細胞、培養組織等の培養物、細菌、ウイルス等の微生物、植物組織、食品等の天然物の加工品等、核酸を含有しているものであれば特に限定されない。

【0015】本発明の方法によって処理する場合、血液、体液、培養細胞等の場合には界面活性剤の作用により細胞を溶解させ、含有される核酸を溶解液中に放出させることが可能となるが、植物等の細胞壁を有する細胞である場合や、組織片等の細胞同志が比較的強固に結合している試料である場合には、細胞が溶解し易くなるよう、ホモジナイズ等の物理的な力により、予め細胞壁を破壊する、結合細胞をバラバラにするなどの前処理を行うことが必要である。これらの前処理については、当業者に公知である。

【0016】本発明において用いる溶解液は、界面活性剤、塩及びキレート剤を含有する。溶解液は界面活性剤の作用により細胞膜や核膜を溶解させるものである。

にリン酸エステル部分を有する重合体であって、親水性の表面を有する固相支持体に接触させる工程、および固相支持体を溶液から分離する工程を含む、核酸の抽出方法を提供する。核酸の吸着した固相支持体は、目的に応じてそのままPCR反応の錫型等に用いても、固相支持体からさらに核酸を溶出させてもよい。

【0011】本発明において、構造単位の少なくとも一部にリン酸エステル部分を有する重合体であって、親水性の表面を有する固相支持体としては、親水性の表面を有する、多孔質微粒子であることが好ましい。特に好ましくは、下記のモノマー

【化2】

【0017】界面活性剤としては、陽イオン性、陰イオン性、両イオン性及び非イオン性のいずれも好適に用いられる。具体的には臭化セチルトリメチルアンモニウム(CTAB)、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、N-ラウロイルサルコシンナトリウム、chaps(3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate)、ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート(Tween-20)等が例示されるが、これらに限定されない。界面活性剤は、溶解液中0.01～2% (w/v)、より好ましくは0.05～5%添加する。

【0018】塩としては、一価陽イオンを与える塩、例えば塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化リチウム、酢酸ナトリウム、酢酸カリウムなどが例示され、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化リチウムが特に好ましい。塩は溶解液中好ましくは0.2～0.5Mとなるよう添加する。

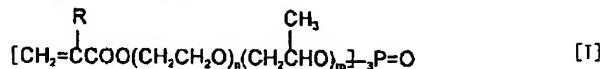
【0019】緩衝剤としては、pHが5～9、より好ましくはpH6～7のトリス-HCl、酢酸ナトリウム、クエン酸、リン酸等が例示されるが、トリス-HCl、クエン酸緩衝液が特に有用である。

【0020】キレート剤は、DNaseやRNase等の核酸分解酵素がMg²⁺の存在下で活性化されるため、これをキレートとして核酸分解酵素の活性を抑えるために添加されるものであり、従来核酸の抽出時に用いられるキレート剤のいずれを用いても良い。好ましくは、EDTA、EGTAである。キレート剤は溶解液中1～100mM、より好ましくは10～50mM添加する。

【0021】溶解処理は、試料と溶解液を混合して行えばよい。試料の種類にもよるが、典型的には体積比として試料1に対して溶解液を2以上、好ましくは試料1に対して溶解液を約4となるよう添加する。溶解処理の方法については限定的ではないが、典型的には溶解液と試料がまんべんなく混合されるように攪拌し、室温で5分以上処理すればよい。溶解処理に際して固相支持体を同時に添加しておいてもよく、また溶解処理終了後に固相

支持体を添加してもよく、あるいは固相支持体と試料を直接接触させた後に溶解液を添加してもよい。ただし、固相支持体と試料を先に接触させる場合には、すぐに溶解液を添加しなくてはならない。

【0022】次いで溶液中へ構造単位の少なくとも一部にリン酸エステル部分を有する重合体であって、親水性の表面を有する固相支持体を添加する。本発明の方法において用いる、構造単位の少なくとも一部にリン酸エステル部分を有する重合体であって、親水性の表面を有する固相支持体とは、分子中にリン酸エステル部分を含有



[式中、Rは水素原子またはメチル基、nは0~30の数を示し、mは0~30の数を示す。但し、m+n≥1である。]と親水性担体とを重合して得られる重合体粒子である。

【0025】本発明の固相支持体に用いられるモノマー[I]は重合性二重結合を有するカルボン酸とアルキレングリコールまたはポリアルキレングリコールとのエステル3モルとのリン酸エステルである。代表的カルボン酸はアクリル酸および/またはメタクリル酸（両者を合わせて（メタ）アクリル酸と記す）である。

【0026】代表的（ポリ）アルキレングリコールは（ポリ）エチレングリコール、（ポリ）プロピレングリコールまたは酸化エチレンと酸化プロピレンのブロックまたはランダム共重合体である。これらの（ポリ）アルキレングリコール鎖は生成する重合体粒子に親水性を付与するためであるが、分子量が大きくなりすぎると重合体粒子の機械的強度が低下するため、n+mはせいぜい30程度までが適当である。nまたはmはそれぞれ0~10が好ましく、n+mは少なくとも1である。特に（ポリ）エチレングリコールが好ましい。

【0027】モノマー[I]はオキシ塩化リンと上記（ポリ）アルキレングリコールの（メタ）アクリル酸エステルとを常套の手段で反応させることにより得ることができる。モノマー[I]は同一分子内に異なった親水基と重合性基を有していてもよい。例えばアクリル酸エステルとメタクリル酸エステル、（ポリ）エチレングリコールエステルと（ポリ）フルビレングリコールエステルあるいは異なる分子量のアルキレングリコール鎖を有するものがモノマー[I]1分子中に混在していてもよい。

【0028】本発明に有用な重合体粒子はモノマー[I]の単独重合体（但し、この単独重合体とはモノマー[I]自体が式[I]で表わされる複数種のモノマー混合物である場合を含む）であってもよいが、親水性モノマーとの共重合体であってもよい。

【0029】使用し得る親水性モノマーはモノマー[I]と重合し得る、好ましくは非イオン性のモノマー

するモノマーを、単独重合もしくは別のモノマーと共に重合して得られる親水性の重合体をいう。

【0023】固相支持体としては、粒子、シート、板、フィルター、繊維状、管等どのような形状であってもよいが、核酸の吸着効率を高めるためには、液体と接触する面積が大きい、多孔質微粒子であることが好ましい。

【0024】特に好ましい粒子は、下記の構造単位モノマー[I]

【化3】

であって分子内に親水性の基を有するものである。イオン性モノマー（例えばアミノ基、カルボキシル基、スルホン酸基等を有するモノマー）はこれを液体クロマトグラフィ用充填剤として用いると、これらの基にもとづく非特異的吸着を生ずるため、その様な機能を利用する場合（例えばイオン交換体）以外はむしろ好ましくない。この様な親水性モノマーの好ましい具体例は、重合性二重結合とヒドロキシル基またはオキシエーテル基を有するモノマー、例えばヒドロキシエチル（メタ）アクリレート、ヒドロキシプロピル（メタ）アクリレート、グリセリン（メタ）アクリレート、ベンタエリスリトール（メタ）アクリレート、オリゴエチレングリコール（メタ）アクリレートおよびオリゴアロビレングリコール（メタ）アクリレート、（オリゴ）アルキレングリコールイタコネート、ジ（オリゴ）アルキレングリコールマレート等が例示される。上記のオリゴエチレングリコールやオリゴアロビレングリコールで代表されるオリゴアルキレングリコール類は2~10個程度の酸化アルキレン重合体であって、モノマーに親水性を付与するため用いる、酸化アルキレンのモル数が多くなると機械的強度が低下する。複数種の親水性モノマーを併用してもよい。

【0030】モノマー[I]と親水性モノマーとの重量比は100:0~1:99、好ましくは90:10~5:95、より好ましくは50:50~10:90である。

【0031】モノマー[I]と親水性モノマーとは同時に重合させてもよく（ランダム・ポリマー）、モノマー[I]を重合させた後、これに親水性モノマーを反応させてもよく（変性ポリマー）、あるいは、親水性モノマーを重合させた後モノマー[I]を反応させてもよい（架橋ポリマー）。さらに両者をオリゴメル化した後共重合させてもよい（ブロック・ポリマー）。これらの共重合の際、モノマー[I]あるいは親水性モノマーを滴下して重合させてもよい。

【0032】上記モノマー類から重合体粒子を得るために特に好適な方法はモノマー[I]と所望により親水性モノマーとを、水と混和しない非反応性有機溶剤と触媒

の存在下に水性懸濁重合させる方法である。

【0033】上述のごとくモノマー[I]と親水性モノマーの反応順序は限定的でなく、モノマー[I]を予め重合させてこれに親水性モノマーを重合させてもよく、両者を同時に重合させてもよく、あるいは親水性モノマーを予め重合させ、次いでこれにモノマー[I]を反応させてもよい。またモノマー滴下順序を交互に繰返して重合させてもよい。

【0034】モノマー成分はモノマー[I]に加えてさらに架橋剤を含んでいてもよい。架橋剤としては例えばエチレングリコールジ(メタ)アクリレート、プロピレングリコールジ(メタ)アクリレート、グリセリンジ(メタ)アクリレート、ペンタエリスリトールジ(メタ)アクリレート、ペンタエリスリトールトリ(メタ)アクリレート、オリゴエチレングリコールジ(メタ)アクリレート、オリゴプロピレングリコールジ(メタ)アクリレート等の親水性架橋剤が例示される。架橋剤の使用量はモノマー[I]と架橋剤合計量の20重量%以下が適当である。

【0035】モノマー[I]と架橋剤との反応は両者を同時に反応させてもよく、予め、モノマー[I]を重合させて、これに架橋剤を反応させてもよい。モノマー成分はモノマー[I]に加えて更に親水性モノマーと架橋剤を含んでいてもよい。この場合の架橋剤の量もモノマー[I]と架橋剤合計量の20重量%以下が適当である。三者は同時に反応させてもよく、あるいは、モノマー[I]と親水性モノマーとを重合させた後、架橋剤で架橋してもよく、あるいは親水性モノマーの重合体に、モノマー[I]と架橋剤を反応させてもよい。

【0036】上記モノマー類の重合は非水系溶剤中で生ずるが、重合がある程度進行すると、重合体は該溶剤に溶解せず析出して微細な重合体粒子として水中に懸濁する。従って、粒径の整った均一な重合体粒子が得られる。有機溶剤を洗浄あるいは揮散により除去すると、粒子中に微細な通気孔が形成されるため、吸着性に優れた多孔質の重合体粒子が得られる。

【0037】上記重合体粒子の製造に用いられる非反応性有機溶剤はモノマー成分を溶解し得るものであって水と混和しないものであればよい。この様な有機溶剤としては芳香族系炭化水素、例えば、ベンゼン、トルエン、キシレン、テトラリン等、アルコール類、例えばブタノール、アミルアルコール、シクロヘキサノール、2-エチルヘキサノール等、ケトン類、例えばメチルエチルケトン、メチルブチルケトン、エステル類、例えば酢酸エチル、酢酸ブチル等が例示される。2種以上の溶剤を混合して、モノマー類の溶解性と生成ポリマーの溶解性、親水性等を適当な範囲に調整してもよい。

【0038】非反応性有機溶剤の使用量はモノマー成分の重量の1~500重量%、好ましくは50~200重量%である。

【0039】モノマー成分は全ての成分をあるいは成分の一部(例えばモノマー[I]、親水性モノマーおよび架橋剤を用いるときは、前二者)を予め上記有機溶剤類に溶解し、これを水中で懸濁重合してもよく、あるいは有機溶剤の水性懸濁液中にモノマー成分またはその一部を滴下重合してもよい。成分の一部を予め重合させたときは、残りの成分を次いで重合反応に供してもよい。

【0040】触媒はラジカル重合開始剤、レドックス重合開始剤、セリウム塩に代表される酸化剤等が用いられる。反応温度で分解が起るラジカル重合開始剤が好ましく、例えば、過酸化ベンゾイル、過酸化ラウロイルなどの過酸化アシル類、アゾビスイソブチロニトリルなどのアゾニトリル類がある。ラジカル重合開始剤の使用量はモノマー[I]と親水性モノマー及び架橋剤の合計に対し、0.3~7重量%であり、好ましくは0.5~5重量%が望ましい。

【0041】重合は水性媒体中で行なう。モノマー[I]および親水性モノマーはいずれも水に溶解性であるため、これらの重合を有機溶剤層中で行なうには、上記モノマー類の水層への分配率を抑制するため適当な塩類を水に溶解させておくのが好ましい。親水性架橋剤をモノマー[I]および/または親水性モノマーと混合して用いる場合も同様である。この様な塩類としては塩化ナトリウム、硫酸ナトリウム、塩化カルシウム等の中性の無機塩であってよく、またこれらに限定されるものではない。塩類の使用量は10~35重量%程度が適当である。

【0042】有機溶剤およびモノマー成分を水に懸濁させるためには超音波あるいはホモミキサー等の物理的手段のみで行なってもよいが、分散剤を併用してもよい。分散剤としては、澱粉、ゼラチンなどの天然高分子物質、CMC、ヒドロキシエチルセルロース、メチルセルロースなどの加工天然高分子物質、ポリビニルアルコール、ポリビニルビロリドン、カーボワックスなどの水溶性高分子物質等が例示される。

【0043】添加量は水に対し0.3~3重量%、好ましくは0.5~1.5重量%が望ましい。反応温度は20~150°C、好ましくは40~100°Cが適当である。

【0044】得られる重合体粒子の細孔容量、孔径の制御は、非反応性有機溶媒の使用量または非反応性有機溶媒の組合せを変えることにより、また粒子の機械的強度および親水性はモノマー[I]と親水性モノマーおよび架橋剤の使用量により制御でき、これらによって本発明の方法に特に好ましく用いられる、粒子径が1~100μm、平均孔径が30~5000Åの重合体粒子を容易に得ることができる。

【0045】本発明において、固相支持体の量は典型的ではないが、固相支持体が粒子径1~1000μm、平均孔径が30~5000Åの重合体粒子である場合には溶解液0.5mlに対して~50mg、好ましくは10~

20mg添加する。

【0046】固相支持体は、予め溶解液と混合しておいて、ここへ試料を添加しても、あるいは溶解処理後に系へ添加してもよい。固相支持体と試料の接触は、固相支持体と試料および溶解液がまんべんなく混合されるようにはよく、その方法としては特に限定されない。典型的には、溶解処理と同時に、あるいは溶解処理後、固相支持体の存在下で1~30分間、より好ましくは5~15分間室温で攪拌して、核酸を含む溶解液と固相支持体表面とを接触させればよい。

【0047】この操作により、溶解液にて細胞膜等が溶解された後、溶解液中に放出された核酸が親水性表面を有する固相支持体粒子へ結合する。一方、担体粒子の親水性が高いため、タンパク質等の不純物は該粒子に吸着されない。このため、核酸を効率良く、高い純度で分離することが可能である。

【0048】次いで、核酸が吸着された固相支持体を溶解液と分離させる。固相支持体として粒子を用いる場合には、これを溶解液から分離するには、遠心分離、デカントーション、済過、などの様々な方法があり、いずれも好適に用いられる。

【0049】次いで得られた固相支持体を洗浄する。洗浄液としては、低級アルコール水溶液、アルコールと緩衝液の混合物、アルコールと塩と緩衝液の混合物などが例示される。特に好ましいのは、塩、緩衝液、および70%程度のエタノールからなる洗浄液である。洗浄方法としては特に限定的ではないが、洗浄液が固相支持体にまんべんなく行き渡るように攪拌し、次いで液と固相を上記のごとき方法にて分離すればよい。

【0050】洗浄した固相支持体は、必要に応じて乾燥させて次のステップに用いる。乾燥方法は限定的でないが、例えば減圧乾燥1~10分、50~70°C、10分以上の加熱乾燥、ドライヤー冷風などを1~2分間あてる通風乾燥、30分以上放置する風乾などが挙げられる。こうして得られる核酸が吸着された固相支持体は使用目的により、そのまま次の操作、例えばPCR法による増幅や制限酵素処理などの各種分析に供してもよいし、担体から核酸を溶出させてもよい。

【0051】固相支持体から核酸を溶出するには、低イオン強度の溶媒を固相支持体に作用させ、加温する。溶出のために用いる低イオン強度の溶液としては、水、TEバッファー(10mM Tris-HCl(pH 7.5) 1mM EDTA(pH 8.0))などが例示される。水を用いるのが便利である。

溶解液：

N-ラウロイルサルコシンナトリウム	0.2%(v/v)
塩化ナトリウム	0.4M
EDTA	20mM
0.1M Tris-HCl (pH 7.0)	

【0057】次いで、固相支持体A 20mgを室温で添加し、10分間攪拌した。フィルター済過により溶解液

る。核酸を溶出させるためには、担体を水またはその他の低イオン強度の溶媒と接触させ、加温する。核酸の溶出のための温度は好ましくは50~90°C、より好ましくは70~80°Cである。

【0052】溶出された核酸は、遠心分離、デカントーション、済過、などの方法にて担体を除き、回収すればよい。

【0053】本発明の方法により得られる核酸はさらなる精製の必要なく、そのままPCR法や電気泳動方法等の增幅若しくは各種分析に供することができる。本発明の方法により、DNAおよびRNAのいずれも抽出することができる。

【0054】本発明はさらに、界面活性剤、塩、緩衝剤およびキレート剤を含む溶解液、および構造単位の少なくとも一部にリン酸エステル部分を有する重合体であって、親水性の表面を有する固相支持体からなる、核酸抽出のためのキットを提供する。本発明の溶解液、および固相支持体としては、上に説明したものがいずれも好適に用いられる。本発明のキットは、本発明の方法の実施に好適に用いられる。

【0055】

【実施例】以下、実施例を挙げて本発明を説明する。

固相支持体の調製

還流冷却器、攪拌器、温度計を備えた300mlの四口セバラブルフラスコに、トリ(メタクリロイルオキシエチル)リン酸を3g、2-ヒドロキシエチルメタクリレートを3g、1-ブタノール6g、アゾビスイソブチロニトリル0.12gを投入した。さらにヒドロキシエチルセルロース1gと塩化ナトリウム40gを溶解させた蒸留水160gを加え、350rpmの回転数で攪拌を行ないながら70°Cで1時間、さらに80°C、4時間加熱した。生成した共重合体は真球で、粒径100~500μmの範囲にあった。生成した粒子を十分に水洗を繰り返し、さらにメタノールで洗浄後、乾燥し、平均孔径をボロシメーターで測定したところ、平均孔径1500Åであった。得られた粒子を固相支持体Aとする。この固相支持体Aを用いて以下の実施例、比較例を行った。

【0056】

【実施例1】陰イオン界面活性剤を用いた血液からのDNA抽出

EDTAを血液1mlに対して1.5mg加えて非凝固処理したヒト末梢血0.1mgを、以下の処方からなる溶解液0.4mlと室温にて混合した。

を除去し、固相支持体Aを新たな溶解液0.5mlにて1回、次いで洗浄液(0.4M塩化ナトリウム、0.1M

トリス-HC1 (pH8.5)、70%エタノール) 0.5m1にて2回洗浄した。洗浄液を沪過して除き、アルコール分を乾燥させた。

【0058】得られた核酸吸着固相支持体Aへ滅菌水0.1m1を添加、攪拌した。これを80°C、10分間加熱し、固相支持体A上に吸着された核酸を滅菌水へ溶出させた。フィルター沪過して固相支持体Aを除き、核酸溶液を回収した。

【0059】得られた核酸(DNA)を常套の方法により電気泳動にかけた。得られた電気泳動写真を図1に示す。エチジウムプロマイドによって染色されたDNAのバンドが示された。なお、図1の各レーンは以下の通りである(左側より)。

レーン1：分子量マーカーλ-Hind III digest(宝酒造社製)

レーン2、3および4：実施例1をn=3で実施した各結果。

実施例1は、本発明の方法がDNAを抽出するのに有用であることを示す。

【0060】

【実施例2】界面活性剤を変えた溶解液を調製して、本発明の方法を実施した。用いた溶解液は以下の通りである：

0.4M 塩化ナトリウム

0.1M Tris-HC1 (pH7.0) 0.4m1
および1)～4) いずれかの界面活性剤0.2% (v/v)

1) セチルトリメチルアンモニウムプロマイド (CTAB)

2) Span-20

3) Tween-20

4) Triton X-100

【0061】EDTAを血液1m1に対して1.5mg加えて非凝固処理したヒト末梢血各0.1m1を、溶解液のそれぞれ0.4m1と室温にて混合した。続いて固相支持体A 20mgを室温にて添加し、10分間攪拌した。フィルター沪過により溶液を除去し、固相支持体Aを新たな各溶解液0.5m1にて1回、次いで洗浄液(0.4M塩化ナトリウム、0.1Mトリス-HC1 (pH8.5)、70%エタノール) 0.5m1にて2回洗浄した。洗浄液を沪過して除き、アルコール分を乾燥させた後、滅菌水0.1m1を添加、攪拌し、80°C、10分間加熱して、固相支持体A上に吸着された核酸を滅菌水へ溶出させた。フィルター沪過にて固相支持体を除き、核酸溶液を回収した。

【0062】得られたDNAを常套の方法により電気泳動にかけた。得られた電気泳動写真を図2に示す。なお、図2の各レーンは以下の通りである。(左側より)

レーン1：分子量マーカーλ-Hind III digest(宝酒造社製)

レーン2：セチルトリメチルアンモニウムプロマイド(CTAB)

レーン3：Span-20

レーン4：Tween-20

レーン5：Triton X-100

【0063】

【実施例3】溶解液中の塩濃度の相違による、血液からのDNA抽出

溶解液中の塩化ナトリウム濃度を0M、0.2M、0.4M、0.6M、および0.8Mとする以外は、実施例1と同じ溶解液を調製した。各溶解液を用い、実施例1と同様にして血液中のDNAを単離した。得られたDNAの電気泳動写真を図3に示す。塩化ナトリウム濃度0.4Mにおいて、強いバンドが確認された。なお、図3の各レーンは以下の通りである(左側より)。

レーン1：分子量マーカーλ-Hind III digest(宝酒造社製)

レーン2：塩濃度0M

レーン3：塩濃度0.2M

レーン4：塩濃度0.4M

レーン5：塩濃度0.6M

レーン6：塩濃度0.8M

【0064】

【実施例4】pHの相違による血液からのDNA抽出
実施例1のTris-HC1 (pH7.0) 緩衝液に代えて以下の各pHの緩衝液を用いる以外は実施例1と同じ溶解液を調製した。各溶解液を用い、EDTAを血液1m1に対して1.5mg加えて非凝固処理したヒト末梢血0.1m1からDNAを抽出した。

【0065】得られたDNAの電気泳動写真を図4に示す。中性pHの溶解液を用いた場合に、最も強いDNAのバンドが認められた。なお、図4の各レーンは以下の通りである(左側より)。

レーン1：分子量マーカーλ-Hind III digest

レーン2：0.1M酢酸ナトリウム緩衝液pH5.0

レーン3：0.1Mクエン酸緩衝液pH5.0

レーン4：0.1M酢酸ナトリウム緩衝液pH6.0

レーン5：0.1Mクエン酸緩衝液pH6.0

レーン6：0.1M Tris-HC1 pH6.0

レーン7：0.1M Tris-HC1 pH7.0

レーン8：0.1M Tris-HC1 pH8.0

【0066】

【実施例5】ポリヌクレアーゼ連鎖反応

実施例1～3で得た核酸を錆型としてPCRを行った。
用いたプライマーは

5'-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC

5'-GGAAATAGACCAATAGGCAG

である。プライマー各1μMおよびTAKARA Taqキットのバッファー×1、TAKARA Taq 1.25U、dNTP(それぞれ最終濃度0.4mM)の混

合物へ各DNA試料25ngを投入し、反応を行った。PCR反応は94℃1分—[94℃20秒—55℃40秒—72℃1分30秒]×30—72℃7分のスケジュールで実施した。

【0067】それぞれの増幅されたDNAの電気泳動写真を図5に示す。なお、図5の各レーンは以下の通りである(左側より)。

1：分子量マーカーφX174-HincII digest(宝酒造社製)

2：陰性コントロール

3：実施例1

4：実施例2-界面活性剤CTAB

5：実施例2-界面活性剤Span-20

6：実施例2-界面活性剤Tween-20

7：実施例2-界面活性剤Triton X-100

8～10無関係のデータ

11：実施例3-塩濃度0M

12：実施例3-塩濃度0.2M

13：実施例3-塩濃度0.4M

14：実施例3-塩濃度0.6M

15：実施例3-塩濃度0.8M

16～無関係のデータ

【0068】

【実施例6】市販DNA抽出系との比較

Dynabeads DNA DIRECT System II(Dynabeads社)を用い、説明書に記載の通り100μlの血液からDNAを抽出した。こうして得られたDNA、実施例1で単離したDNAおよび実施例1で得られた溶出を行わずDNAが吸着された粒子をそれぞれ錆型として、実施例5と同一のプライマーおよび反応条件を用いてPCRを行った。

【0069】増幅されたDNAの電気泳動写真を図6に示す。図6の各レーンは以下の通りである(左側より)。

1～3：無関係

4：Dynabeads DNA DIRECT System II

5：実施例1、溶出されたDNA

6：Dynabeads DNA DIRECT System II

7：実施例1、核酸吸着固相支持体A

【0070】市販のDynabeads DNA DIRECT System IIでは、目的物以外にも弱いバンドがいくつか認められたが、実施例1で得たDNA試料からは、目的のDNAのみが増幅されたことがわかる。市販品では100μlという比較的多量の血液をそのまま取り扱うのには無理があるようである。

【0071】

【実施例7】少量の血液から抽出したDNAの増幅
EDTAを血液1mlに対して1.5mg加えて非凝固処理したヒト末梢血10μlを実施例1と同じ溶解液0.4mlと混合、攪拌した。続いてすぐに固相支持体

A5mgを添加し、10分間攪拌した。フィルターにて溶解液を除去した後、固相支持体Aを新たな溶解液で1回、次いで実施例1と同じ洗浄液にて2回洗浄し、次いでアルコール分を乾燥させた。次いで得られた核酸吸着固相支持体Aを50μlの滅菌水中へ懸濁させた。懸濁液から10μlを分取してこれを錆型とし、PCR反応に供した。または、同様にして得たDNA吸着固相支持体粒子Aへ滅菌水50μlを添加し、80℃に10分間加熱してDNAを水中に溶出させた。次いでフィルターにより沪過して担体粒子を除き、得られたDNA溶液10μlをPCRへ供した。

【0072】PCR反応は、それぞれ実施例5と同じ条件にて行った。増幅されたDNAを実施例1と同様にして電気泳動にかけた。結果を図7に示す。図7中、右から5列目が溶出したDNAを、6列目がDNA吸着固相支持体粒子をそれぞれ錆型としてPCRを実施した場合の結果である。

【0073】

【実施例8】固相支持体粒子の相違

血液10μlを、実施例1と同じ溶解液0.4mlと混合、攪拌した。固相支持体として以下のものを用いた：

1) 固相支持体A

2) 2-ヒドロキシエチルメタクリレートとエチレンジコールジメタクリレートの共重合体多孔質微粒子(EG)

粒径：100μm(60～140μm)

孔径：約2500Å

重合比：2-ヒドロキシエチルメタクリレート：エチレンジコールジメタクリレート：トリ(メタクリロイルオキシエチル)リン酸=5：4：1

3) シリカゲル コスモシール75C₁₈-OPN(ナカライトスク社製)

平均粒径75μm(分布42～105μm)

平均細孔径120Å

4) 架橋セルロース セルロファインGL-2000(チッソ社製)

崩潤時粒径45～105μm

分画タンパク質分子量～3000000

5) デキストラン粒子 Sephadex G-150(ファルマシア社製)

崩潤時粒径115～350μm

分画タンパク質分子量5×10³～3×10⁵

6) アガロース粒子 Sepharose 4B(ファルマシア社製)

崩潤時粒径45～165μm

分画タンパク質分子量6×10⁴～2×10⁷

それぞれを、固相支持体A20mgと同体積となるよう添加し、室温で10分間攪拌した。続いてフィルター沪過にて溶解液を除き、粒子を新たな溶解液、次いで実施例1と同じ洗浄液で洗浄した後、アルコール分を乾燥さ

せた。得られた粒子へ滅菌水 $100\mu l$ をそれぞれ添加し、攪拌した後 80°C 、10分間加熱してDNAを抽出した。フィルター汎過により粒子を除き、DNA溶液を回収した。なお、Sephadose 4Bについては、 80°C で溶解するため溶出作業を 37°C にて行った。また、比較のため実施例1と同じ固相支持体についても 37°C の溶出作業を行った。

【0074】得られたDNA溶液を実施例1と同様にして電気泳動にかけた。結果を図8に示す。なお図8のレーンは以下の通りである(左側より)。

レーン1：分子量マーカー λ -Hind III digest (宝酒造社製)

レーン2：実施例1の固相支持体A (80°C にて溶出)

レーン3：EG

レーン4：コスモシール75C18

レーン5：セルロファイン JCL-2000

レーン6：Sephadex G-150

レーン7：Sephadose 4B

レーン8：実施例1の固相支持体A (37°C にて溶出)

【0075】レーン6はバンドが太くDNA量が多いが、DNA溶出液が着色するなどの不純物を含有している。レーン2、3および8のみにおいて、実質的な溶出が認められた。

【0076】

【実施例9】実施例8で得られた各溶出液 $10\mu l$ を、実施例5と同じ条件にてPCR反応に供した。増幅されたDNAを実施例1と同様にして電気泳動にかけた。結果を図9に示す。なお、図9の各レーンは、以下の通りである：

レーン1：分子量マーカー $\phi X 174$ -Hinc II digest (宝酒造社製)

レーン2：陰性コントロール

レーン3：実施例1の固相支持体A (80°C にて溶出)

レーン4：EG

レーン5：コスモシール75C18

レーン6：セルロファイン JCL-2000

レーン7：Sephadex G-150

レーン8：Sephadose 4B

レーン9：実施例1の固相支持体A (37°C にて溶出)

レーン10：無関係のデータ

【0077】上記よりレーン3、4および9、即ち固相支持体Aおよびリン酸エステル部分を含有する固相支持体であるEGを用いて抽出したDNAのみが増幅され、他の担体で抽出されたDNAは増幅されていなかった。

【図面の簡単な説明】

【図1】 実施例1の電気泳動の結果を示す写真である。

【図2】 実施例2の電気泳動の結果を示す写真である。

【図3】 実施例3の電気泳動の結果を示す写真である。

【図4】 実施例4の電気泳動の結果を示す写真である。

【図5】 実施例5の電気泳動の結果を示す写真である。

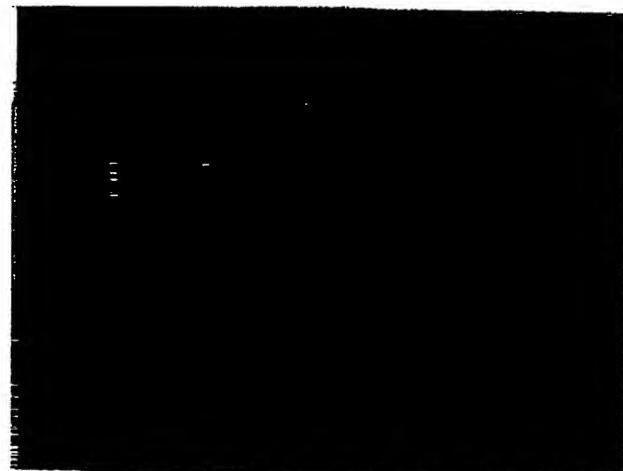
【図6】 実施例6の電気泳動の結果を示す写真である。

【図7】 実施例7の電気泳動の結果を示す写真である。

【図8】 実施例8の電気泳動の結果を示す写真である。

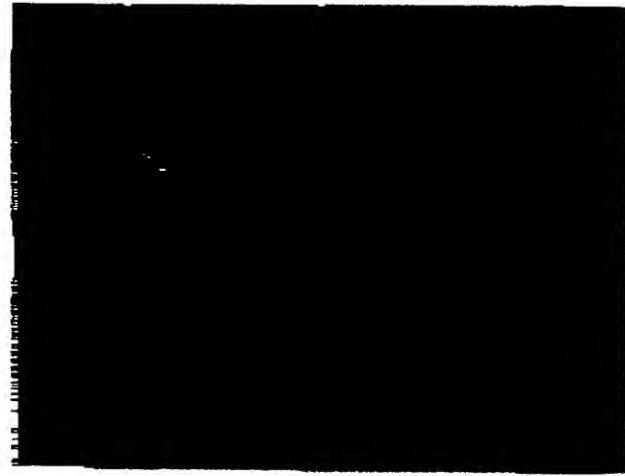
【図9】 実施例9の電気泳動の結果を示す写真である。

【図1】

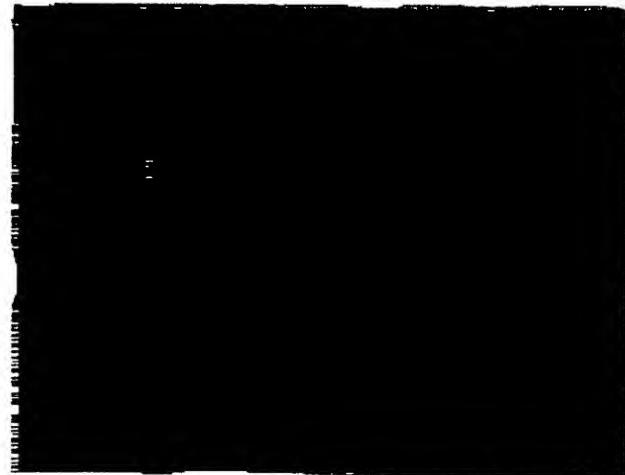


(10) 01-204462 (P2001-204462A)

【図2】



【図3】

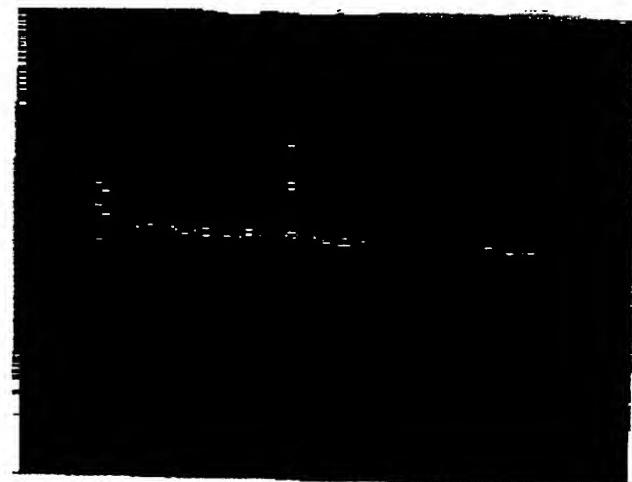


(11) 01-204462 (P2001-204462A)

【図4】

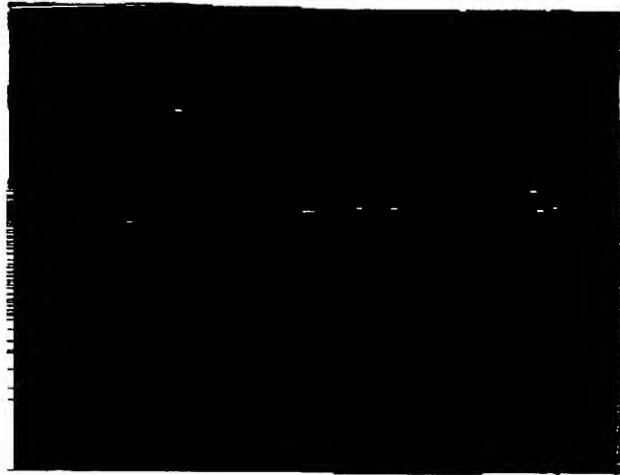


【図5】

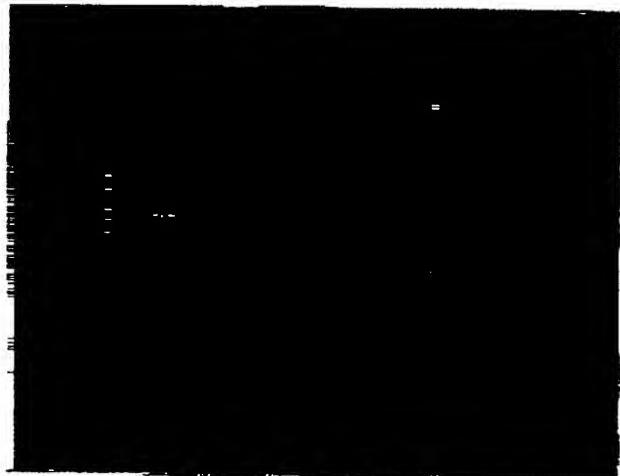


(12) 01-204462 (P2001-204462A)

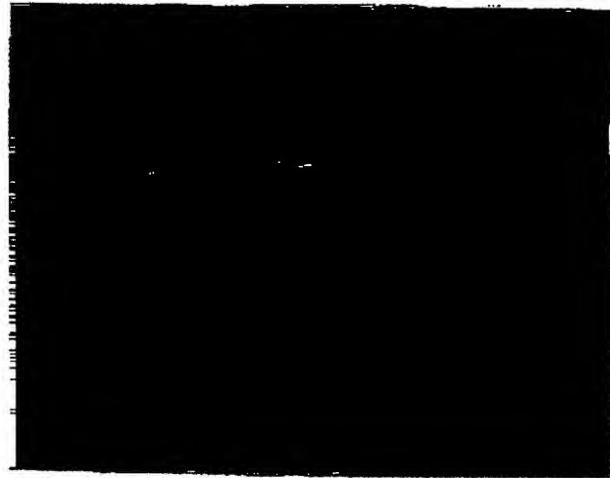
【図6】



【図7】



【図8】



【図9】



フロントページの続き

(72)発明者 大島 邦裕
大阪府寝屋川市下木田町14番5号 倉敷紡
績株式会社技術研究所内

(72)発明者 山本 良平
大阪府寝屋川市下木田町14番5号 倉敷紡
績株式会社技術研究所内

F ターム(参考) 4B033 NA01 NA45 NB04 NB12 NB36
NB62 NC04 ND05 ND08 ND12